Untersuchungen über die Möglichkeit der Lebendkonservierung von Toxoplasmen bei tiefen Temperaturen

Berlin 1965

Volker Robl

Aus dem Institut für Veterinär-Parasitologie der
Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. J. Boch

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE MÖGLICHKEIT DER LEBENDKONSERVIERUNG VON TOXOPLASMEN BEI TIEFEN TEMPERATUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

vorgelegt von

V o l k e r R o b l
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1965
Journal Nr. 492

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. J. Boch
Referent: Prof. Dr. J. Boch
Korreferent: Prof. Dr. F. Schmidt-Hoensdorf

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 2. 1965
Tag der Promotion : 17. 4. 1965

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 2

II. Methoden und Möglichkeiten der Lebendkonservierung von Protozoen, insbesondere von Toxoplasmen (anhand der Literatur) 3

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methodik 10

B. Ergebnisse

1. Lebendkonservierung von freien Toxoplasmen bei verschiedenen Temperaturen 13

2. Lebendkonservierung von Toxoplasmazysten bei verschiedenen Temperaturen 20

IV. Besprechung der Ergebnisse 22

V. Zusammenfassung 27

VI. Literaturverzeichnis 28

Lebenslauf

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546516_0073

I. Einleitung

Nur durch zeitraubende Überimpfungen auf weiße Mäuse war es bisher möglich, Toxoplasmen für Versuchszwecke in Laboratorien zu halten. Allerdings geht die Vermehrung bei virulenten Stämmen so rasch vor sich, daß schon nach 4-5 Tagen der Tod der Versuchstiere eintritt. Um den Fortbestand eines solchen virulenten Stammes zu sichern, müssen innerhalb kurzer Zeitspannen Passagen angelegt werden. Der Aufwand an Kosten, Zeit und Material ist groß. Ähnliches gilt auch für avirulente Stämme; denn es müssen für jeden Stamm mehrere Mäuse in einzelnen Käfigen gehalten werden. So haben wir an unserem Institut beispielsweise 45 verschiedene Toxoplasma-Stämme in derartigen Einzelkäfigen.

Die Möglichkeit der Lebendkonservierung der Parasiten im Tiefkühlschrank würde eine wesentliche Vereinfachung und Erleichterung bedeuten. Es könnte Platz durch das Fehlen der Käfige, Arbeitszeit der Tierpfleger und das Futter für die Mäuse eingespart werden. Außerdem würde die Infektionsgefahr für das Pflegepersonal vermindert.

Bis heute ist allerdings noch keine vollkommen zuverlässige Methode für die Konservierung von Toxoplasmen bekannt. Da andererseits bei avirulenten Stämmen freie Toxoplasmen nur kurze Zeit und dann sehr spärlich im Exsudat vorkommen, ist es notwendig Zysten zu konservieren. Diese überleben längere Lagerungszeiten in Geweben.

Ich erhielt daher die Aufgabe, das Verhalten von Zysten vor allem tiefen Temperaturen gegenüber zu untersuchen, zumal die Möglichkeit einer leichteren Konservierung der Dauerformen als der freien Toxoplasmen anzunehmen war.

II. Methoden und Möglichkeiten der Lebendkonservierung von Protozoen, insbesondere von Toxoplasmen (anhand der Literatur)

Ergebnisse der verschiedenen Autoren haben gezeigt, daß die Überlebensdauer von tierischen Geweben von vielen Faktoren abhängig ist. Das die Parasiten umgebende Medium, die günstigste Temperatur für die Lagerung sowie die Art des Tiefgefrierens sind von ausschlaggebender Bedeutung für die Konservierung. Doch auch bei optimaler Berücksichtigung dieser Faktoren gelingt die Lebendkonservierung nur bei einigen Protozoenarten, wobei Toxoplasma gondii viele Schwierigkeiten bereitet.

Wie alle Versuche bisher ergaben, sind höhere Temperaturen für die Lagerung ungeeignet. Die Protozoen, insbesondere auch Toxoplasmen, sind meist schon nach kurzer Zeit abgetötet (JACOBS und MELTON, 1960; DE ROEVER-BONNET, 1960; RIFAAT und MORSY, 1963 u.a.).

Je tiefer die Aufbewahrungstemperatur gewählt wird, desto länger lassen sich in der Regel die Erreger infektiös erhalten. Sehr gute Erfolge sind bei Babesien, Trypanosomen, Lamblien und Anaplasmen bei Temperaturen um -76°C von MC ENTEGART (1954), HOPPENRATH (1956), REUSSE (1956), BEMRICK (1961), CUNNINGHAM, LUMSDEN und WEBBER (1963) sowie von BARNETT (1964) erzielt worden.

Von ausschlaggebender Bedeutung ist die Einfriertechnik. Unterschiede der einzelnen Methoden bestehen im wesentlichen nur in der Geschwindigkeit, mit der die Parasiten eingefroren werden. REUSSE (1956) erreichte die Konservierung tierpathogener Protozoen durch langsames Einfrieren seiner Proben. Sie wurden zunächst nach dem Zuschmelzen der Ampullen für 30 Minuten bei 4°C aufbewahrt. Der Gefriervorgang erfolgte im Alkoholbad (95%) unter Hinzufügen von Trockeneis. Bei einer Temperatur von 4-5°C legte er die Ampullen aus dem Kühlschrank in den Alkohol und setzte die weitere Abkühlung langsam (10°C pro Minute) fort. Bei -20°C wurden die Proben in die Tiefkühltruhe gebracht. REUSSE machte außerdem auch

Versuche mit schnellem Einfrieren. Dabei wurden die Ampullen aus dem Kühlschrank in auf -55°C abgekühlten Alkohol und anschließend gleich in die Tiefkühltruhe gebracht.

Eine weitere Differenzierung findet man in den Untersuchungen von EYLES und M. (1956). Neben dem schnellen Einfrieren (Eis-Alkohol-Mischung, dann in die Tiefkühltruhe) beschreiben sie noch drei weitere Methoden, nämlich ein verlangsamtes Einfrieren (Abkühlung auf -16°C innerhalb von 15 Minuten, dann Tiefkühltruhe), ferner ein langsames (Absinken der Temperatur nach 36 Minuten auf -18°C, dann -60°C) und schließlich ein extrem langsames Einfrieren. Hier gaben sie die Ampullen in einen vollkommen mit aufsaugender Baumwolle umwickelten Korb. Nach 70 Minuten waren -14°C, nach 160 Minuten -41°C erreicht. In einer Trockeneis-Alkohol-Mischung wurden die Ampullen dann nach 48 Stunden aufbewahrt. Diese Methoden sind mit geringen Abweichungen auch von WEINMAN und MCALLISTER (1947), MC ENTEGART (1954), POLGE und SOLTYS (1957), MÜHLPFORDT (1960) und BEMRICK (1961) beschrieben und bei der Aufbewahrung verschiedener Protozoen verwendet worden.

WEINMAN und MCALLISTER (1947) experimentierten mit Toxoplasmen, die sie langsam einfroren. Zum Auftauen wurden die Ampullen in einem Wasserbad von 40-42°C einige Sekunden bewegt. Dem Auftauvorgang maßen sie eine besondere Bedeutung bei. MC ENTEGART (1954) fror Trichomonaden schnell und langsam ein und taute sie im Wasserbad (40°C) für 15-20 Sekunden auf. POLGE und SOLTYS (1957) froren Ampullen mit Trypanosomen schnell (gleich auf -79°C), langsam (2 Minuten in auf -15°C abgekühlten Alkohol und dann bis -79°C) und noch langsamer (Ampullen in Alkohol von 18-20°C, Abkühlen durch Hinzufügen von Trockeneis: 2°C pro Minute bis -20°C, dann 5°C pro Minute von -20° bis -79°C). Das Auftauen erfolgte im Wasserbad von 15 bzw. 20°C. BEMRICK (1961) ließ seine Proben, die er ebenfalls bei -70°C lagerte, zum Auftauen ungefähr eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen.

Bei der Konservierung von Lebewesen bettet man diese in unterschiedliche Substanzen ein, die bei Temperaturen über dem

Gefrierpunkt die Funktionen einer Nährsubstanz ausüben, andere bei tieferen Temperaturen dem Schutze dienen sollen.

SABIN und OLITSKY (1937) verwendeten zur Aufbewahrung von Toxoplasmen bei 4°C eine Tyrodelösung als Nährsubstanz. Sie konnten die Parasiten 14 Tage lang ansteckungsfähig erhalten. EICHENWALD (1948) benutzte toxoplasmenhaltige Milch. Er führte seine Versuche bei 3°C durch und konnte die Parasiten bis zu 8 Tagen lebend konservieren. In entrahmter Milch stellten MANWELL und DROBECK (1951) bei 4°C Aufbewahrungstemperatur nach 18 Tagen noch lebende Erreger fest.

DE ROEVER-BONNET (1960) untersuchte neben physiologischer Kochsalzlösung auch 10%iges normales menschliches Serum, unverdünnte Milch, 10%ige Milch, 1%ige Milch in physiologischer Kochsalzlösung, 1% Schweinealbumin in physiologischer Kochsalzlösung, Fleischbrühe, Fleischbrühe mit Penicillin und Streptomycin, abgerahmte Milch, Natriumboratpuffer ph_{11}, 1% Kükenembryoemulsion in physiologischer Kochsalzlösung und Leitungswasser auf ihre schützende Wirkung bei Lagerungsversuchen von Toxoplasmen. Verdünnte Milch bezeichnete sie als gutes Medium, während um das Zehnfache verdünnte Milch geringere Konservierungsqualitäten hatte. Die Versuche mit 1%iger Milch zeigten noch weniger Erfolge. Entrahmte Milch war schlechter als normale, ähnlich wirkte Schweinealbumin. Die anderen oben erwähnten Mittel waren ungeeignet.

Bei Proben, die bei 4°C und 1%iger frischer Mäusegehirnemulsion als Nährsubstanz gelagert wurden, war auffallend, daß nach 24stündiger Lagerung die infizierten Mäuse schneller starben als nach 2stündiger. In der für sie günstigen Nährlösung hatten sich die Toxoplasmen nach Ansicht der Autorin vermehrt. Nach dreitägiger Lagerung hatte dieses Medium seine nährenden Funktionen verloren (DE ROEVER-BONNET, 1960).

Um die, bei einer Temperaturerniedrigung durch die Kristallisationsbildung in den Zellen auftretende Zerstörung auszuschalten, wurde von LUYET und GEHENIO (1940) vorgeschlagen, durch schnelles Einfrieren eine Erstarrung der Protozoen, ohne daß es zu einer Kristallbildung kommt, zu erreichen.

Eine besondere Bedeutung mißt NEUMANN (1955) beim Einfrieren von Lebewesen der Auswahl eines geeigneten Schutzmittels zu. Das beim Einfrieren verwendete Medium soll die Parasiten schützen. Es hat nach MÜHLPFORDT (1960) die Aufgabe das Wasser zu binden, da Wasser, wenn es fest an Moleküle gebunden ist, nicht gefriert. Wichtig ist dabei, daß das Schutzmedium selbst nicht toxisch wirkt.

Bewährt hat sich Glycerin in Konzentrationen von 5-15% (POLGE und M., 1949). MC ENTEGART (1954) hatte mit 10%igem Glycerin beim Einfrieren von Trichomonaden gute Erfolge. POLGE und M. (1957) bestätigten in ihren Versuchen mit Trypanosomen die Wirkung der Schutzmedien. Sie benutzten 5,10 und 20%iges Glycerin, Ringerlösung und Serum, wobei sich das 10%-ige Glycerin am besten bewährte. BEMRICK (1961) fror Lamblien mit einem Zusatz von 14,2-50% Glycerin, Äthylalkohol, Kochsalzlösung und Tyrodelösung ein. Die besten Erfolge erzielte er bei -70°C und 50%igem Glycerin. BARNETT (1964) erhielt in 7%igem Glycerin Babesia bigemina bei -76°C über 720 Tage am Leben.

REUSSE (1956), CHANDLER und WEINMAN (1956) sowie EYLES und M. (1956) verwendeten 5-10%iges Glycerin und froren verdünntes toxoplasmenhaltiges Peritonealexsudat damit bei -76°C ein. EYLES und M. (1956) konnten auf diese Weise bei einem Versuch Toxoplasmen bis zu 209 Tagen am Leben erhalten.

Versuche, Protozoen, insbesondere Toxoplasmen durch Eintrocknen oder Lyophilisation über längere Zeit am Leben zu erhalten, scheiterten (GEISSLER, 1955). MANWELL und M. stellten 1945 fest, daß freie Toxoplasmen in eingetrocknetem Gewebe bei Zimmertemperatur einen Tag nicht überlebten. WILDFÜHR (1956) konnte zwar bei einer Temperatur von 4°C nach 12 Stunden bei eingetrockneten Toxoplasmen eine krankmachende Wirkung noch feststellen; nach einem Tag war das Material aber nicht mehr ansteckungsfähig. Mit ansteigenden Temperaturen verringerte sich dieser Zeitraum immer mehr. Bei 18-20°C betrug er noch bis zu 8 Stunden, bei 37°C nur noch eine Stunde.

JACOBS und MELTON (1960) konnten Toxoplasmazysten, ohne daß sie ihre infektiöse Wirkung verloren, weder einfrieren noch trocknen. In eingetrocknetem Gehirngewebe waren sie schon nach 24 Stunden nicht mehr lebensfähig.

Wie schon erwähnt, ist die Überlebensdauer der Toxoplasmen auch von der Temperatur abhängig. Je höher sie ist, desto kürzer ist die Überlebenszeit der Parasiten. Durch kurzes Erhitzen auf 100°C werden sie sicher abgetötet (RIFAAT und MORSY, 1963). EICHENWALD (1948) stellte fest, daß toxoplasmenhaltige Milch ihre Infektiosität bei 50°C in 15 Minuten und bei 54°C schon in 10 Minuten verlor. MANWELL und DROBECK (1951), BAUER (1952), ORLANDELLA (1957) sowie RIFAAT und MORSY (1963) bestätigten diese Versuchsergebnisse. Sie fanden, daß Toxoplasmen in mit Kochsalzlösung verdünntem Peritonealexsudat bei Temperaturen von 50°C in 10-20 Minuten, bzw. nach 5 Minuten bei höheren Temperaturen (60-80°C) nicht mehr infektiös sind.

JACOBS und MELTON (1960) bewahrten zystenhaltiges Gehirn in Fleischbrühe bei 50°C für 30 Minuten und bei 56°C für 10 Minuten auf. Obwohl Zysten im allgemeinen resistenter sind als freie Toxoplasmen, waren sie nach dieser Zeit vernichtet. Ein Erwärmen auf 60°C für einen Zeitraum von 15 und 20 Minuten wirkte tödlich.

Bei 37°C konnte ORLANDELLA (1957) die freien Parasiten 8-12 Stunden, DE ROEVER-BONNET (1960) 24 Stunden, RIFAAT und MORSY (1963) sogar bis zu 36 Stunden lebensfähig erhalten. DE ROEVER-BONNET benutzte dabei verdünntes Peritonealexsudat von mit dem BK-Stamm infizierten Mäusen, das sie mit dem entsprechenden Medium (10%ige Milch, 1%ige Mäusegehirnemulsion und 10%iges menschliches Serum) versetzte.

Bei Temperaturen zwischen 21 und 23°C (Zimmertemperatur) waren freie Toxoplasmen nach 5-6 Tagen nicht mehr lebensfähig (ORLANDELLA, 1957). Nach DE ROEVER-BONNET (1960) starben viele Parasiten bei 18-20°C bereits nach 2 Stunden, nach 24 Stunden waren alle tot. In 10%iger Milch überlebten fast alle zwar 2 Stunden, waren aber nach 24 Stunden ausnahmslos abgestorben. MRÁZ (1960) verwendete in seinen Versuchen reines Peritonealexsudat und konnte bei 18°C die Erreger 18 Tag lang am Leben erhalten. RIFAAT und MORSY (1963) berichten vo

einem Überleben nach 9-10 Tagen bei Raumtemperatur.

Schon 1913 bewahrten MESNIL und SARRAILHE gestorbene Mäuse bei 18°C auf und verimpften nach 18 bzw. 24 und 30 Stunden das toxoplasmenhaltige Peritonealexsudat an Versuchsmäuse. Sie erhielten sowohl bei 18 und 30 Stunden positive als auch nach 24 und 30 Stunden negative Ergebnisse. Diese Unterschiede führten sie auf den verschieden starken Bakteriengehalt der einzelnen Tiere zurück. KÄSS (1955) verimpfte das Gehirn an akuter Toxoplasmose gestorbener Mäuse, die bei 16-20°C 3 Tage lang aufbewahrt wurden, mit Erfolg.

EICHENWALD gelang es 1948 die Erreger bei 3°C (Kühlschranktemperatur) bis zu 8 Tagen lebensfähig zu erhalten. Er benutzte für seine Versuche toxoplasmenhaltige Milch und physiologische Kochsalzlösung. 14 Tage überlebten die Parasiten nach ähnlichen Angaben von BAUER (1952), GEISSLER (1955) und GAŁUSZKA und SZAFLARSKI (1962). In unverdünnter Ascitesflüssigkeit gelang es MÖLLER (1955), bei 4°C bis zu 34 Tagen infektiöse Toxoplasmen nachzuweisen. Ähnliche Ergebnisse erzielte MRÀZ (1959). DE ROEVER-BONNET (1960) macht keine Angaben über die maximale Überlebensdauer der Erreger in ihren Versuchen. Sie bezeichnet 1%ige frisch angesetzte Mäusegehirnemulsion als ein sehr gutes Medium für Toxoplasmen bei 4°C. 10%iges menschliches Serum in Kochsalzlösung setzt nach ihren Erfahrungen die Infektiosität der Parasiten herab.

Mit dem Überleben von Toxoplasmen in Geweben, die in den meisten Fällen an akuter Infektion gestorben waren, befaßten sich mehrere Autoren. SABIN und OLITSKY (1937) konnten die Parasiten in einem infizierten Mäusegehirn in Tyrodelösung ohne Verlust ihrer Ansteckungsfähigkeit bei 4-5°C 14 Tage lang aufbewahren. PINKERTON und HENDERSON (1941) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie konnten Toxoplasmen im Gehirn eines Menschen bei 4°C 8 Tage lang lebensfähig erhalten. Demgegenüber stellten MANWELL und M. (1945) fest, daß nach 48stündiger Aufbewahrung infizierter Gewebsteile bei Kühlschranktemperatur eine Infektion nur noch selten erfolgte. Eine Konservierung von 24 Stunden bedeutete keinen Verlust

der Ansteckungsfähigkeit. KEAN und GROCOTT (1948) konnten mit Gehirnemulsion eines Kindes, dessen Leiche 31 Stunden bei 0-4°C aufbewahrt wurde, Meerschweinchen infizieren. MANWELL und DROBECK (1951) bewahrten in Magermilch eingelegte Mäusegehirne 18 Tage lang bei 4°C auf. KÅSS (1955) verimpfte das Gehirn infizierter Mäuseleichen, die bei Kühlschranktemperatur gelagert wurden. Sie waren noch infektiös. Er benutzte Mäuse, die nach einer Infektion mit dem RH-Stamm gestorben waren. GEISSLER (1955) kam zu ähnlichen Erkenntnissen bei 4°C aufbewahrtes Gehirn mit Toxoplasmose infizierter Mäuse zeigte nach einer Woche noch lebensfähige Parasiten. Leber, Lunge und Herz konnten unter gleichen Bedingungen nur 2 Tage infektiös gehalten werden.

WEINMAN und CHANDLER (1956) konnten Zysten bei 2-5°C im Gehirn von Schweinen einen Monat lang am Leben erhalten. Muskelgewebe akut erkrankter Tiere war nach 10 Tagen bei dieser Temperatur noch ansteckungsfähig. JACOBS und MELTON (1960) lagerten Gehirnemulsion bis zu 68 Tagen bei Kühlschranktemperatur ohne Verlust ihrer Infektiosität.

KASS (1955) stellte fest, daß bei -10°C nach 12-16 Stunden in Mäuseleichen noch lebende Toxoplasmen vorhanden waren. Nach JACOBS und MELTON (1960) hielt sich zystenhaltiges Gehirngewebe bei -15°C weniger als 24 Stunden. EYLES und COLEMAN (1956) beschrieben die Aufbewahrung von freien Toxoplasmen bei -20°C. Sie benutzten Glycerin als Schutzmittel und konnten die Parasiten 128 Tage lang infektiös konservieren. Bei -35°C überlebten in mit isotonischer Zuckerlösung versetztem Peritonealexsudat die Erreger 4 Wochen (ROGER und ROGER, 1957).

Bei einer Temperatur von -76°C konnten WEINMAN und MCALLISTER (1947) Toxoplasmen nur für die kurze Zeit von 3 Tagen am Leben erhalten. Diese Feststellung überraschte, da bei anderen Protozoen Schwierigkeiten, wenn überhaupt, nur während des Einfrierens auftraten. Haben die eingefrorenen Proben einmal die erwähnte Temperatur erreicht, ist es nicht schwierig, sie über lange Zeiträume ohne wesentlichen Verlust ihrer

Lebensfähigkeit und Infektiosität aufzubewahren. 1956 konnten WEINMAN und CHANDLER mit einem 15%igen Glycerinzusatz nach 184 Tagen Lagerung noch akute Erkrankungen hervorrufen. REUSSE (1956) sowie EYLES und M. (1956) verwendeten ebenfalls als Schutzmittel Glycerin und froren verdünntes Peritonealexsudat damit bei -76°C ein. REUSSE (1956) stellte bei den nach einer Woche aufgetauten Proben keine Änderung der Infektiosität fest. EYLES und M. (1956) hielten ebenfalls auf diese Weise Toxoplasmen bis zu 209 Tagen am Leben.

III. Eigene Untersuchungen

Nach Studium der Literatur war auffallend, daß zwar viele Versuche über die Lebendkonservierung von freien Toxoplasmen angestellt wurden, nur wenige Arbeiten aber über Zysten vorliegen. Um nun Aufschlüsse über die Lagerungsmöglichkeiten der enzystierten Formen zu erhalten, wurde die bei den freien Erregern angewendete Methodik übernommen und die Zysten ähnlichen Bedingungen unterworfen.

A. Material und Methodik

Um für die Versuche freie Toxoplasmen in ausreichender Menge zu erhalten, wurden Mäuse mit dem stark virulenten BK-Stamm infiziert. Dabei injizierte ich den Tieren, unter Zusatz von 2500 I.E. Penicillin und Streptomycin, Peritonealexsudat einer infizierten getöteten Maus. Nach 2 Tagen wurden die Mäuse getötet, das Fell am Bauch entfernt, mit einer Spritze Exsudat entnommen und dieses anschließend auf das Vorhandensein von Toxoplasma gondii mikroskopisch quantitativ untersucht. Entsprach das Exsudat in Reinheit und Menge den Anforderungen, so wurden jeweilig 2ml der gewählten Schutzlösung der Maus in die Bauchhöhle injiziert und nach Umspülung der Organe wieder entnommen. 0,3ml wurden dann in sterile 2ml Ampullen abgefüllt, gekennzeichnet, zugeschmolzen und der entsprechenden Konservierungsmethode unterworfen.

Für die Versuche mit Zysten benutzte ich einen von BOCH und

ROMMEL (1963) aus einem klinisch gesunden Hund sowie mehrere von BOCH, ROMMEL und JANITSCHKE (1964) aus Schlachtschweinen isolierte avirulente und zystenbildende Toxoplasmenstämme. Zur Zystengewinnung wurden Mäuse mit je 0,5ml zystenhaltiger Gehirnsuspension (ein Gehirn mit 2ml physiologischer Kochsalzlösung) intraperitoneal beimpft. 5 Wochen später tötete ich die infizierten Tiere, entnahm unter möglichst sterilen Bedingungen das Gehirn und untersuchte ein kleines Stück des Gehirngewebes auf das Vorhandensein von Zysten. Danach wurde das Gehirn in einer Flasche mit 3ml der entsprechenden Schutzlösung und Glasperlen ungefähr 2 Minuten geschüttelt. Davon wurden dann 0,3ml in Ampullen abgefüllt.

Als Schutzlösungen benutzte ich auf Grund der Literatur folgende erfolgversprechende Medien:
Ringerlösung,
Physiologische NaCl-Lösung mit 5% Glycerin,
Physiologische NaCl-Lösung mit 10% Glycerin,
Physiologische NaCl-Lösung mit 15% Glycerin,
Physiologische NaCl-Lösung mit Gelatine, 2g gelöst in 10ml,
Physiologische NaCl-Lösung mit D (+) Glukose, MERCK, 3g gelöst in 10ml,
Physiologische NaCl-Lösung mit Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut, MERCK, 5g gelöst in 10ml,
γ - Globulin ASID, 20ml enthalten 2g γ - Globulin vom Rind und isotonische Kochsalzlösung ad 20ml,
Frische Kuhmilch,
Sterile Kuhmilch,
Sterile 25%ige Kuhmilch (Sterile Kuhmilch verdünnt mit 3 Teilen physiologischer NaCl-Lösung).

Um möglichst viele Konservierungsmethoden von Toxoplasmen zu erproben, führte ich die Versuche bei 18-20°C (Zimmertemperatur), bei 4°C (Kühlschranktemperatur), bei -18 bis -20°C sowie bei -76°C durch.

Das Einfrieren bei -76°C erfolgte auf 3 verschiedene Arten:
a. Schnelles Einfrieren
Ein schnelles Einfrieren wurde dadurch erreicht, daß ich die Ampullen gleich nach dem Verschließen in die Tiefkühltruhe brachte.

b. Langsames Einfrieren

Die Ampullen wurden zunächst in den Kühlschrank (4°C) gestellt, dort 1/2 Stunde gelassen und anschließend in ebenso temperierten 96%igen Methylalkohol gelegt. Der Alkohol wurde dann in 15 Minuten durch Hinzufügen von Trockeneisstücken auf -40°C abgekühlt. Schon nach kurzer Zeit war der Inhalt der Ampullen gefroren. Danach wurden sie in die Tiefkühltruhe gebracht (-76°C) und unter einer Schicht von Kohlensäure-Trockeneis gelagert.

c. Sehr langsames Einfrieren

Diese dritte Methode unterschied sich von den vorhergehenden dadurch, daß der Einfriervorgang noch langsamer vorsich ging. Die Proben wurden zunächst für 2 Tage in einem Kühlschrank deponiert und dann, wie oben beschrieben, langsam eingefroren.

Nach Ablauf der jeweiligen Versuchszeit erfolgte in jedem Falle, also auch bei den Proben, die bei Zimmertemperatur, 4°C und -20°C gelagert wurden, ein Auftauen bzw. Erwärmen im Wasserbad von 37°C für 10 Minuten. Die Ampullen wurden dann geöffnet und der Inhalt Mäusen in die Bauchhöhle injiziert.

Bei den Versuchen mit freien Formen wurde die Bauchhöhlenflüssigkeit erkrankter oder gestorbener Mäuse mikroskopisch auf das Vorhandensein von Toxoplasmen untersucht. Nicht gestorbene Mäuse wurden nach 3 Wochen getötet, das Gehirn entnommen, in Schüttelflaschen eine Suspension durch Hinzufügen von physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und Mäusen erneut intraperitoneal verabfolgt. Eine serologische Untersuchung der 1. Passage führt durch die abgetöteten freien Toxoplasmen in der Bauchhöhle zu niedrigen bis mittleren Titern, obwohl die Mäuse nicht infiziert sind. Ein eindeutiges Ergebnis erhält man erst durch die folgenden Passagen. Nach 4-5 Wochen wurde diesen Mäusen aus den Schwanzvenen Blut entnommen und im Sabin-Feldman-Test serologisch untersucht. Der Test wurde zunächst in einer Verdünnung von 1:4

durchgeführt. Positive und zweifelhafte Seren wurden dann in Verdünnungen bis zu 1:4000 nach ROMMEL und MÜLLER (1963) ausgewertet, in Zweifelsfällen auch in der KBR angesetzt und Passagen angelegt. In Hirnquetschpräparaten positiver Mäuse wies ich Zysten grundsätzlich mikroskopisch nach.

B. Ergebnisse

Um einige Methoden der Haltbarmachung von Toxoplasma gondii miteinander vergleichen zu können, war es notwendig, unterschiedliche Schutzmedien, Gefriersysteme und Lagerungstemperaturen zu verwenden. Die am aussichtsreichsten erscheinenden Verfahren wurden dann erneut an einer größeren Anzahl von Proben wiederholt.

1. Lebendkonservierung von freien Toxoplasmen bei verschiedenen Temperaturen

bei 18-20°C

Das toxoplasmenhaltige Peritonealexsudat wurde in diesem Versuch mit Ringerlösung, 5, 10 und 15%igem Glycerin, Glukose, Pepton und Gelatine versetzt und in Ampullen eingeschmolzen. Nach 2, 10, 50, 100 und 200 Tagen wurde jeweils der Inhalt einer Ampulle einer Maus intraperitoneal injiziert.

Der Nachweis der Toxoplasmen erfolgte mikroskopisch im Bauchhöhlenexsudat erkrankter oder gestorbener Mäuse. Überlebten die Tiere, so wurden sie nach 3 Wochen getötet, Passagen angelegt und diese dann nach 4-5 Wochen im Sabin-Feldman-Test serologisch untersucht.

Während das 2 Tage bei dieser Temperatur aufbewahrte Exsudat grundsätzlich Mäuse tötete, also noch infektionstüchtige Toxoplasmen enthielt, waren nach 10 Tagen nur noch die in Ringerlösung, 5% und 10%igem Glycerin und Pepton aufbewahrten Parasiten am Leben.

Nach einem Zeitraum von 50 Tagen waren die Erreger bei einer Temperatur von 18-20°C (Zimmertemperatur) nicht mehr infektionsfähig.

bei 4°C

Eine Aufbewahrung bei 4°C (Kühlschranktemperatur) hätte eine wesentliche Vereinfachung bei der Konservierung und Lagerung der Toxoplasmen bedeutet. Allerdings war schon vor dem Beginn der Versuche damit zu rechnen, daß die Überlebenszeiten bei dieser Temperatur, bekannt durch ähnliche Versuche mit Toxoplasmen und anderen Protozoen, z.B. Babesien, Trypanosomen und Trichomonaden, nicht lang genug sein würden, um eine größere Anwendung zu erfahren.

Die Versuche zeigten, daß in allen Medien, mit Ausnahme von Glukose, nach 2 Tagen noch lebende Erreger vorhanden waren. Pepton und Gelatine erwiesen sich als relativ günstige Medien, aber auch hier waren die Erreger nur noch am 10. Tage infektionsfähig. Den Zeitraum von 50 Tagen überlebten die Parasiten nicht.

bei -20°C

Auch die Versuche, bei -20°C eine längere Lebensfähigkeit zu erreichen, schlugen fehl. Die Ergebnisse ähneln denen bei 18-20°C und 4°C.

Über die Zeit von 2 Tagen konnten die Parasiten, ausgenommen das Schutzmittel Ringerlösung, in allen anderen Medien infektiös erhalten werden, für 10 Tage jedoch nur in 10%igem Glycerin, Pepton und Gelatine. Nach 50 Tagen waren keine lebenden Erreger mehr vorhanden.

Damit ist auch dieses Verfahren ungeeignet für die Aufbewahrung von freien Toxoplasmen.

bei -76°C

Nur die Konservierung bei Temperaturen um -76°C hatte bei Versuchen mit anderen Protozoen (z.B. Babesien, Trypanosomen und Plasmodien) und Anaplasmen Erfolge gebracht, die auch davon abhängig waren, auf welche Art man die Lebewesen eingefroren hatte. Die Methoden unterscheiden sich im wesentlichen in der Geschwindigkeit, mit der beim Einfrieren die Aufbewahrungstemperatur erreicht wird.

Beim schnellen Einfrieren enthielten nach 2 Tagen noch alle Proben lebende Parasiten, nach 10 Tagen waren die mit Glukose eingefrorenen Toxoplasmen bereits abgetötet, während nach 50 und 100 Tagen nur noch die Ampullen mit Ringerlösung und 5%igem Glycerin lebende Erreger enthielten. Nach 200tägiger Lagerung waren die Parasiten in keinem Falle mehr ansteckungsfähig (Tabelle 1).

Medium	Aufbewahrungszeitraum (in Tagen)				
	2	10	50	100	200
Ringer-lösung	+	+	+	+	
5%iges Glycerin	+	+	+	+	-
10%iges Glycerin	+	+	-	-	-
15%iges Glycerin	+	+	-		-
Glukose	+	-		-	-
Pepton	+	+	-	-	-
Gelatine	+	+	-	-	-

Tabelle 1 : Überlebensdauer von freien Toxoplasmen bei -76 °C und schneller Einfriertechnik

\+ = lebende Erreger nachweisbar
\- = alle Toxoplasmen abgestorben

Mit den erfolgversprechenden Medien, Ringerlösung, Glycerin, Glukose und außerdem noch frischer Milch wurde ein zweiter Versuch angesetzt. Nach 60 Tagen waren die Erreger in Ringerlösung und Glycerin (5,10 und 15%) noch ansteckungsfähig.

Bei Glukose und frischer Milch war es nach diesem Zeitraum nicht mehr möglich, in den mit den Proben beimpften Mäusen lebende Erreger nachzuweisen. Bei einer Lagerung von 7 Tagen konnten sie ohne merkbaren Verlust ihrer Infektiosität aufgetaut werden. Nach 14 Tagen gelang es allerdings nicht mehr mit den in dem Schutzmedium Glukose eingefrorenen Toxoplas-

men Mäuse anzustecken. Frische Milch hatte ebenfalls keinen guten schützenden Effekt; nach 14 Tagen starben von 5 Mäusen nur noch 3 an akuter Toxoplasmose (Tabelle 2).

Medium	Aufbewahrungszeitraum (in Tagen)									
	7		14		60		100		120	
	Anzahl der Mäuse									
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Ringer-lösung					3	2	3	2	4	1
5%iges Glycerin					5		4	1	4	1
10%iges Glycerin					5		5		4	1
15%iges Glycerin					5		3	2	4	1
Glukose	5			5		5		5		5
frische Milch	4	1	3	2		5		5		5

Tabelle 2 : Wiederholung der in Tabelle 1 dargestellten Versuche an einer größeren Zahl von Proben unter besonderer Berücksichtigung der günstigen Schutzmittel

Als gutes Medium bewährte sich beim langsamen Einfrieren physiologische Kochsalzlösung mit 5 und 10%igem Glycerinzusatz sowie Pepton. Es gelang damit, die Parasiten 200 Tage am Leben zu erhalten.

In Glukose und Ringerlösung überlebten freie Toxoplasmen zwar 10 Tage, aber nach 50 Tagen waren alle abgestorben. Über physiologische Kochsalzlösung mit einem Zusatz von 15% Glycerin und Gelatine konnten in dieser Versuchsreihe keine vergleichenden Angaben gemacht werden, da 3 bzw. 2 Mäuse, ohne daß sie vorher untersucht werden konnten, gestorben waren. Die anderen Versuchstiere überlebten die Infektion. Die angelegten Passagen zeigten im Sabin-Feldman-Test Titer von 1:4 bzw. 1:16. (Tabelle 3).

Medium	Aufbewahrungszeitraum (in Tagen)				
	2	10	50	100	200
Ringer-lösung	+	+	-	-	-
5%iges Glycerin	+	+	+	+	+
10%iges Glycerin	+	+	+	+	+
15%iges Glycerin		-		-	
Glukose	+	+	-	-	-
Pepton	+	+	+	-	+
Gelatine	-		-		-

Tabelle 3 : Überlebensdauer von freien Toxoplasmen bei -76°C und langsamer Einfriertechnik

+ = lebende Erreger nachweisbar
- = alle Toxoplasmen abgestorben

Eine Wiederholung mit jeweils 5 Mäusen zeigte dann, daß in Glycerin und Ringerlösung die Erreger über 120 Tage aufzubewahren sind. In Glukose und frischer Milch riefen die Toxoplasmen nach 7tägiger Aufbewahrung noch akute Erkrankungen bei Mäusen hervor; nach 14 Tagen überlebten bei Glukose alle, bei frischer Milch 2 Versuchstiere. Nach 60 Tagen war in keinem Fall ein Überleben der Parasiten bei diesen beiden Medien festzustellen (Tabelle 4).

Bei der Methode des sehr langsamen Einfrierens zeigten sich Ringerlösung, 5 und 10%ige Glycerinlösung sowie Gelatine als gute Medien. Toxoplasmen überlebten in ihnen 200 Tage, in 10%igem Glycerin nur 100 Tage.

Glukose und Pepton erwiesen sich als ungeeignet. Infektionstüchtige Erreger ließen sich in diesen Schutzlösungen nur nach 2 bzw. 10 Tagen nachweisen (Tabelle 5).

Medium	Aufbewahrungszeitraum (in Tagen)									
	7		14		60		100		120	
	Anzahl der Mäuse									
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Ringer-lösung					3	2	3	2	4	1
5%iges Glycerin					5		4	1	4	1
10%iges Glycerin					5		4	1	5	
15%iges Glycerin					4	1	4	1	4	1
Glukose	5		5			5		5		5
frische Milch	4	1	3	2		5		5		5

Tabelle 4 : Wiederholung der in Tabelle 3 dargestellten Versuche an einer größeren Zahl von Proben unter besonderer Berücksichtigung der günstigsten Schutzmittel

Medium	Aufbewahrungszeitraum (in Tagen)				
	2	10	50	100	200
Ringer-lösung	-	+	+	+	+
5%iges Glycerin	+	+	+	+	+
10%iges Glycerin	+	+	+	+	-
15%iges Glycerin	-	+	+	-	+
Glukose	+	+	-	-	-
Pepton	+	+	-	-	-
Gelatine	+	+	-	-	+

Tabelle 5 : Überlebensdauer von freien Toxoplasmen bei -76°C und sehr langsamer Einfriertechnik

\+ = lebende Toxoplasmen nachweisbar
\- = alle Erreger abgestorben

Bei weiteren Versuchen wurde die gute Brauchbarkeit von Ringerlösung, 5, 10 und 15%igem Glycerin bestätigt. Toxoplasmen waren nach 120 Tagen noch ansteckungsfähig, während bei den Medien Glukose und frischer Milch nach 7 Tagen von jeweils 5 Mäusen nur noch 1 bzw. 3 Versuchstiere an akuter Toxoplasmose starben. Nach 14tägiger Lagerung ließen sich bei Verwendung der letzten beiden Medien keine lebenden Erreger mehr nachweisen (Tabelle 6).

	Aufbewahrungszeitraum (in Tagen)									
	7		14		60		100		120	
Medium	Anzahl der Mäuse									
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Ringerlösung					5		3	2	4	1
5%iges Glycerin					5		5		5	
10%iges Glycerin					5		4	1	4	1
15%iges Glycerin					5		4	1	4	1
Glukose	1	4		5		5		5		5
frische Milch	3	2		5		5		5		5

Tabelle 6 : Wiederholung der in Tabelle 5 dargestellten Versuche an einer größeren Zahl von Proben unter besonderer Berücksichtigung der günstigen Schutzmittel

Zusammenfassend zeigten die Versuche mit freien Toxoplasmen, daß ein Konservieren über längere Zeiträume nur bei Temperaturen um -76°C zu erreichen war. Am besten bewährten sich die langsamen Einfriermethoden unter Zusatz der Schutzmedien 5 und 10%iges Glycerin sowie Pepton. Nach 200 Tagen konnten mit derart aufbewahrten Proben Versuchsmäuse infiziert werden. Gute Schutzmittel sind weiterhin Ringerlösung und 15%iges Glycerin.

Bei Temperaturen von 18-20°C (Zimmertemperatur), 4°C (Kühlschranktemperatur) und -20°C (Tiefkühltruhe) starben die Erreger schon nach kurzer Zeit.

2. Lebendkonservierung von Toxoplasmazysten bei verschiedenen Temperaturen

Über Aufbewahrungsversuche mit Toxoplasmazysten ist in der Literatur bisher nur wenig berichtet worden. Da bekannt ist, daß Zysten verschiedenen Umwelteinflüssen gegenüber resistenter sind als Einzelparasiten, lag die Vermutung nahe, daß eine Lebendkonservierung möglich sei.

Für meine Versuche wählte ich 11 verschiedene Schutzlösungen, die sich bei der Aufbewahrung von Protozoen bewährt hatten, aus: Ringerlösung, 5, 10 und 15%iges Glycerin sowie Gelatine, D-Glukose, Pepton, Gammaglobuline, frische, sterile und 25%ige sterile Milch. Nach 2, 10, 50, 100 und 200 Tagen Lagerung wurde Mäusen diese mit einem Schutzmittel versehene zystenhaltige Gehirnsuspension intraperitoneal verabfolgt.

bei 18 - 20°C

War es möglich, freie Toxoplasmen wenigstens bei Ringerlösung, 5 und 10%igem Glycerin und Pepton bei dieser Temperatur über 10 Tage lebensfähig zu erhalten, so waren alle Zysten nach diesem Zeitraum schon nicht mehr infektiös. Im Falle des Glycerins gelang es nicht einmal sie bis zu 2 Tagen lebensfähig aufzubewahren.

bei 4°C

Nach 2tägiger Aufbewahrung waren nur die mit Gelatine zusammen gelagerten Erreger nicht mehr ansteckungsfähig. In Gammaglobulin, Pepton und Milch gelang es dagegen sie 10 Tage lang am Leben zu erhalten. Interessanterweise blieben Zysten bei 5% Glycerin 50 Tage infektiös. Nach 100 und 200 Tagen ließen sich mit den Proben Versuchsmäuse nicht mehr anstecken.

bei -20°C

Ähnlich den Versuchen mit Einzelparasiten ließen sich auch bei dieser Temperatur keine längeren Überlebenszeiten erzielen. Nach 2 Tagen waren die Zysten bei den Proben mit Glycerin, Glukose, Globulin und Pepton bereits abgestorben. Wie bei der Aufbewahrung bei 4°C im Kühlschrank erwies sich auch hier Milch als das beste Schutzmittel. Nach 50 Tagen wurden

noch lebende Erreger in diesem Medium festgestellt. Der schützende Effekt der frischen, sterilen und 25%igen sterilen Milch reichte aber auch nicht aus, die Zysten 100 Tage lebend zu konservieren.

bei $-76^{o}C$

Aufgrund vielfach beschriebener Lebendkonservierungen verschiedener Protozoen (z.B. Babesien, Trypanosomen u.a.) über längere Zeiträume lag die Vermutung nahe, daß eine Aufbewahrung bei diesen Temperaturen am erfolgversprechendsten wäre.

Sieht man beim schnellen Einfrieren von den beiden Fällen ab, in denen eine Maus nach 100 Tagen durch eine mit frischer Milch eingefrorene Hirnsuspension und eine andere nach 10 Tagen mit einer 25%igen sterilen Milchlösung infiziert werden konnte, so ist es bestenfalls gelungen, mit einem Teil des eingefrorenen Materials Mäuse nach 2 Tagen zu infizieren. Es handelte sich dabei um 5%iges Glycerin, Glukose, Gammaglobulin, Gelatine und frische Milch.

Bei einer Wiederholung der Versuche mit den 3 verschiedenen Milchschutzlösungen konnte die Ansteckungsfähigkeit der Zyste selbst über 10 Tage in keinem Fall erhalten werden. Dementsprechend waren Mäuse nach 70 und 120 Tagen auch nicht mehr zu infizieren.

Beim langsamen Einfrieren konnten Zysten in frischer Milch über 200 Tage lebend konserviert werden. Es handelt sich dabei aber um einen einmaligen Vorgang; denn in Wiederholungsversuchen, die unter möglichst gleichen Bedingungen an jeweils 5 Mäusen stattfanden, gelang es nicht ein einziges Mal, eine Maus zu infizieren. Schon nach 2 Tagen wiesen die Proben keine lebenden Erreger mehr auf.

Bei der sehr langsamen Einfriermethode gelang es nur in einigen Fällen jeweils eine Maus zu infizieren, nach 2 Tagen durch die mit steriler Milch eingefrorene Probe, nach 10 Tagen bei Ringerlösung und Pepton und nach 50tägiger Lagerung bei mit frischer Milch versetzter Hirnsuspension. Bei erneuten Versuchen ließ sich aber auch hier eine Wiederholung nicht durchführen.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Da bei vielen anderen Protozoen (z.B. Trypanosomen, Trichomonaden, Plasmodien, Babesien) und bei Anaplasmen eine Lebendkonservierung durch tiefe Temperaturen schon seit längerer Zeit durchgeführt wird, lag der Gedanke nahe, dies auch mit Toxoplasmen zu versuchen. Es war unser Ziel, eine möglichst lange und sichere Erhaltung der Infektiosität der Parasiten zu erreichen, da damit eine Vereinfachung wissenschaftlicher Arbeiten auf diesem Gebiet verbunden wäre. Es könnten Kosten, Zeit, Material und Platz eingespart werden; denn für Versuchszwecke ließen sich bisher Toxoplasmen nur durch zeitraubende Überimpfungen auf Versuchstiere erhalten.

Da eine Infektion sowohl mit freien Formen von Toxoplasma gondii intraperitoneal als auch oral mit Zysten des Erregers zu erreichen ist, wurden beide Formen ähnlichen Bedingungen unterworfen.

Der Nachweis der Infektion erfolgte bei meinen Versuchen bei freien Toxoplasmen durch mikroskopischen Nachweis der Erreger im Peritonealexsudat gestorbener oder kranker Mäuse, bei den enzystierten Formen serologisch im Sabin-Feldman-Test. Die serologischen Ergebnisse wurden in der Regel durch die mikroskopische Untersuchung von Gehirnquetschpräparaten bestätigt.

Bei 18-20°C bewahrte MRAZ (1959) freie Toxoplasmen in reinem Bauchhöhlenexsudat 18 Tage auf. RIFAAT und MORSY (1963) gelang eine Lebendkonservierung über die Zeit von 9-10 Tagen. Zu ähnlichen Ergebnissen kam ich bei allen getesteten Schutzmitteln. Ich stellte eine sichere Überlebenszeit von 2 Tagen, bei Ringerlösung, 5 und 10%igem Glycerin sowie Pepton sogar von 10 Tagen fest.

JACOBS und M. (1960) berichten von einer Lagerung der enzystierten Formen in physiologischer Kochsalzlösung über 24 Stunden ohne Verlust ihrer infektiösen Wirkung. Ich konnte nach 48 Stunden, mit Ausnahme der Glycerinmedien, noch Tiere mit Zysten infizieren, ein Vorgang, der nach 10 Tagen in keinem

Fall mehr gelang. Es zeigte sich also, daß freie Formen bei Zimmertemperatur länger überlebten als Zysten.

Bei 3°C hielt EICHENWALD (1948) in toxoplasmenhaltiger Milch Einzelparasiten bis zu 8 Tagen lebensfähig. BAUER (1952), GEISSLER (1955) und GAŁUSZKA und SZAFLARSKI (1962) konservierten freie Toxoplasmen bis zu 14 Tagen bei Kühlschranktemperatur. Längere Überlebenszeiten erzielten MÖLLER (1955) und MRÀZ (1959) in reinem Peritonealexsudat. Sie berichten von einer 34 - bzw. 32tägigen Lagerung. In Geweben gelang es SABIN und OLITSKY (1937), MANWELL und DROBECK (1951) sowie JACOBS und M. (1952) freie Toxoplasmen bis zu 18 Tagen am Leben zu erhalten. SABIN und OLITSKY (1937) konnten nach 14 Tagen mit einem in Tyrodelösung liegenden infizierten Mäusegehirn noch Versuchstiere anstecken, JACOBS und M. (1952) noch nach 17 Tagen mit einem in frische Pepton-Fleischbrühe eingelegten Gehirn. MANWELL und DROBECK (1951) benutzten entrahmte Milch und konnten in Gehirnen infizierter Mäuse nach 18 Tagen noch ein Überleben von Toxoplasmen feststellen. Diese Werte entsprechen annähernd meinen erzielten Ergebnissen, da nach 10 Tagelanger Aufbewahrung von freien Toxoplasmen in Pepton und Gelatine noch Versuchstiere infiziert werden konnten.

Wesentlich länger ließen sich bei dieser Temperatur Zysten aufbewahren. Bei meinen Versuchen beobachtete ich, daß in mit Ringerlösung versetzter Gehirnsuspension Zysten nur nach 2 Tagen noch infektiös waren, während mit einem 5%igen Glycerinzusatz 50tägige Lagerung gut überstanden wurde. Ähnlich Ergebnisse erzielten WEINMAN und CHANDLER (1956). Sie konnte Zysten im Gehirn von Schweinen 30 Tage lang am Leben erhalte JACOBS und M. (1960) berichten von einem Überleben bei 4°C nach 68 Tagen in physiologischer Kochsalzlösung. Die enzystierten Formen überleben bei dieser Temperatur also wesentlich länger als die freien Toxoplasmen.

Bei einem Einfrieren auf -20°C tritt bei den Einzelparasiten zwar eine Verringerung der Infektiosität auf, EYLES und COLEMAN (1956) konnten aber trotzdem nach einer Lagerung von 128

Tagen Versuchstiere anstecken. Obwohl in der Art der Versuchsausführungen kaum Unterschiede vorhanden waren, sogar das gleiche Schutzmittel (Glycerin) verwendet wurde, gelang es mir nur in einem Fall nach 10 Tagen bei Mäusen eine akute Toxoplasmose hervorzurufen. Ein kleiner Unterschied bestand in der Zeitdauer des Auftauens. Im Gegensatz zu EYLES und COLEMAN, welche die Ampullen 5 Minuten im Wasserbad von 37°C beließen, waren es bei meinen Versuchen 10 Minuten. Wäre die längere Auftauzeit von großer Bedeutung, so hätte sich ihr negativer Einfluß auch bei den Proben, die nur 2 Tage lang gelagert wurden, bemerkbar machen müssen. Diese waren jedoch zumeist positiv.

Mit Milch als Schutzmedium konnten Zysten 10 Tage lang lebensfähig erhalten werden. Ähnliches hatten JACOBS und M. (1960) bei -15°C versucht. Sie froren komplette zystenhaltige Mäusegehirne ein. Schon nach 24 Stunden gelang ihnen keine Infektion von Mäusen mehr. Sie stellten fest, daß ein Einfrieren und Trocknen eine Ansteckung durch Zysten unmöglich macht. Meine Versuche zeigten dagegen, daß Zysten durchaus nicht immer durch eine Abkühlung auf -20°C abgetötet werden. Eine längere Lagerung bei dieser Temperatur vertrugen sie allerdings nicht. Dadurch haben diese Befunde unter Umständen in der Lebensmittelhygiene eine Bedeutung, zystenhaltiges Fleisch tauglich zu machen. Ein kurzes Einfrieren tötet Zysten nicht mit Sicherheit ab.

Bei Temperaturen um -76°C konnten WEINMAN und MCALLISTER (1947) freie Toxoplasmen nicht länger als 3 Tage lebensfähig erhalten. In einem Alkoholbad wurden die Ampullen, bis der Inhalt gefroren war, bewegt und dann auf -76°C weiter abgekühlt. Das Auftauen erfolgte in einem Wasserbad von 40-42°C für einige Sekunden. Sie sahen in der Art des Auftauens einen wesentlichen Faktor für das Überleben der Organismen. CHANDLER und WEINMAN berichteten 1956, daß bei -70°C und 15% Glycerinzusatz nach 184 Tagen noch infektionstüchtige Parasiten vorhanden waren. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen EYLES und COLEMAN (1956). In 10%igem Glycerin überlebten die Toxoplasmen bei

-78°C 209 Tage. Bei der gleichen Temperatur überstanden die Erreger, nach Angaben von REUSSE (1956), unter Zusatz von 7,5% Glycerin nur 7 Tage.

Die Aufbewahrungstemperatur von ungefähr -76°C kann durch schnelles, langsames und sehr langsames Einfrieren erreicht werden. Von LUYET und GEHENIO (1940) und anderen Autoren wurde beschrieben, daß es bei langsamem Erniedrigen der Temperaturen unter den Gefrierpunkt zu Molekülveränderungen und damit zu einer Schädigung des Materials kommt. Unter der Wirkung von Schutzmitteln erzielte ich gerade bei langsamen und sehr langsamen Einfriermethoden die besten Ergebnisse. Ich konnte zwar die Resultate von EYLES und COLEMAN (1956), die beim schnellen Einfrieren durch sofortiges Eintauchen in eine Trockeneis-Alkohol-Mischung einen vollkommenen Verlust der Ansteckungsfähigkeit der Toxoplasmen beobachteten, nicht bestätigen, erhielt aber wie sie die besten Ergebnisse beim langsamen Einfrieren mit einer 5%igen Glycerin-Schutzlösung. Mit diesem Medium kann man freie Toxoplasmen also mit großer Sicherheit über längere Zeit bei tiefen Temperaturen aufbewahren. Von 5 eingefrorenen Proben waren alle positiv. Als gute Medien zeigten sich darüber hinaus 10% und 15%ige Glycerin- sowie Ringerlösung. Pepton und Gelatine wiesen unterschiedliche Ergebnisse auf. Glukose und frische Milch waren unbrauchbar. Auffallend ist, daß EYLES und COLEMAN beim sehr langsamen Einfrieren die günstigsten Überlebenszeiten erhielten. Bei meinen Versuchen zeigte sich das beschriebene langsame Einfrieren dem sehr langsamen überlegen. Eingefrorene Toxoplasmen waren in beiden Fällen jedoch teilweise nach 200 Tagen noch infektiös.

Vergleichende Versuche mit Zysten sind, meines Wissens, bei diesen Temperaturen über längere Zeiträume nicht durchgeführt worden.

Die Einfriermethoden entsprachen denen bei den freien Toxoplasmen. Trotzdem gelang es nicht, Zysten mit Sicherheit infektiös zu erhalten.

Bei langsamem Einfrieren und dem Zusatz von frischer Milch konnte sogar nach 200 Tagen eine Maus noch mit zystenhaltiger Gehirnsuspension infiziert werden. Dieser Vorgang ließ sich allerdings nicht wiederholen, obwohl immer möglichst gleiche Bedingungen zugrunde gelegt wurden. Das gleiche gilt für die Versuche mit der sehr langsamen und schnellen Einfriermethode. Einmal konnten die Zysten beim schnellen Einfrieren 100 Tage, ein anderes Mal bei der sehr langsamen Methode 50 Tage lang lebensfähig konserviert werden. Schutzmittel war auch in diesen Fällen frische Milch. Wiederholungsversuche waren ergebnislos. Damit handelt es sich bei den positiven Befunden wohl um zufällige, nicht regelmäßig auftretende Erscheinungen.

Besonders auffallend ist bei diesen Versuchen die Tatsache, daß freie Toxoplasmen tiefen und höheren (18°C) Temperaturen gegenüber wesentlich resistenter sind als Toxoplasmazysten. Nur bei 4°C hatten die Zysten eine längere Überlebenszeit.

V. Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß verschiedener Lagerungstemperaturen und Schutzmittel auf die Überlebensdauer von freien und enzystierten Formen von Toxoplasma gondii untersucht.

Mit Sicherheit konnten freie Toxoplasmen unter Zusatz von 5 und 10%igem Glycerin beim langsamen Einfrieren über 200 Tage (längster untersuchter Zeitraum) infektiös erhalten werden. Als gute Medien erwiesen sich ferner Ringerlösung und 15%iges Glycerin. Glukose, Pepton, Gelatine und frische Milch brachten keine verwertbaren Erfolge. Eine längere Aufbewahrung von freien Toxoplasmen bei Zimmertemperatur (18-20°C), im Kühlschrank (4°C) und bei -20°C war nicht möglich. Die längste Überlebenszeit war bei 18-20°C 10 Tage (Ringerlösung, Pepton, 5 und 10%iges Glycerin), bei 4°C 10 Tage (Pepton und Gelatine), bei -20°C (Pepton und Gelatine sowie 10%iges Glycerin) 10 Tage.

Zysten sind, mit den von mir angewandten Methoden, mit Sicherheit über längere Zeiträume nicht infektiös zu erhalten. Bei langsamer Einfriertechnik wurde die längste Überlebenszeit (200 Tage) bei -76°C mit frischer Milch erreicht. Auch bei schnellem und sehr langsamem Einfrieren erwies sich frische Milch als das beste Schutzmittel. Bei der schnellen Einfriermethode konnten Zysten 100 Tage, ein anderes Mal bei der sehr langsamen Technik 50 Tage lang lebensfähig aufbewahrt werden. Diese Ergebnisse mit Zysten waren allerdings nicht reproduzierbar. Die längste Überlebenszeit war bei 18-20°C 2 Tage (alle Medien, mit Ausnahme des Glycerins), bei 4°C 50 Tage (5% Glycerin) und bei -20°C 50 Tage(Milch).

VI. Literaturverzeichnis

1. Barnett, S.F. The preservation of Babesia bigemina, Anaplasma centrale and A. marginale by deep freezing. Vet. Rec. 76, 4-8 (1964).

2. Bauer, F. Toxoplasma gondii - Untersuchungen über Widerstandsfähigkeit gegen physikalische und chemische Einflüsse. Z. Tropenmed. Parasit. 3, 497-499 (1952).

3. Bemrick, W.J. Effect of low temperatures on trophozoites of Giardia muris. J. Parasit. 47, 573-576 (1961).

4. Boch, J., u. M. Rommel: Serologische Untersuchungen an Berliner Hunden auf Toxoplasmose. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 76, 292-296 (1963).

5. Boch, J., M.Rommel u. K. Janitschke: Beiträge zur Toxoplasmose des Schweines. II. Untersuchungen von Schlachtschweinen auf Toxoplasmainfektionen. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 77, 244-247 (1964).

6. Chandler, A.H., u. D. Weinman: Prolonged storage of Toxoplasma at -70°C. Amer. J. Clin. Path. 26, 323-329 (1956).

7. Cunningham, M.P., W.H.R. Lumsden u. W.A.F. Webber: Preservation of viable trypanosomes in lymph tubes at low temperature. Exper. Parasit. N.Y. 14, 280-284 (1963).

8. Eichenwald, H. Experimental toxoplasmosis. Amer. J. Dis. Child. 76, 307-315 (1948).

9. Eyles, D.E., N. Coleman u. D.J. Cavanaught: Preservation of Toxoplasma gondii by freezing. J. Parasit. 42, 408-419 (1956).

10. Gałuszka, J., u. J. Szaflarski: Badania nad zjadliwością toksoplazm przechowywanych in vitro. Wiad. Parazyt. 8, 525-530 (1962).

11. Geissler, H. Erhaltung der Lebensfähigkeit der Toxoplasmen. Zbl. Bakt. I. Orig. 164, 134-136 (1955).

12. Hoppenrath, J.G. Versuche zur Konservierung von lebenden Trypanosomen, Trichomonaden, Toxoplasmen mittels Tiefkühlung und Vakuumgefriertrocknung. Vet. Diss., Gießen (1956).

13. Jacobs, L., F.E. Jones u. M.L. Melton: The survival of Toxoplasma gondii in various suspending media.
J. Parasit. 38, 293-297 (1952).

14. Jacobs, L., J. Remington u. M.L. Melton: The resistance of the encysted form of Toxoplasma gondi
J. Parasit. 46, 11-21, (1960).

15. Kåss, E. The viability of Toxoplasma in mouse car cass.
Acta path. Microbiol. Scand. 36, 84-88 (

16. Kean, B.H. u. R.G. Grocott: Congenital toxoplasmosis.
J. Amer. Med. Ass. 136, 104-108 (1948).

17. Luyet, B.J. u. P.M. Gehenio: Life and death at low temper tures.
Normandy (1940).

18. Luyet, B.J. u. P.M. Gehenio: Effect of ethylene glycol in protecting various amoeboid organisms against freezing injury.
J. Protozool. 1 (Suppl. Abstr. 35), 7 (1

19. Manwell, R.D., E. Coulsten, E.C. Binckley u. V.P. Jones: Mammilian and avian toxoplasma.
J. Inf. Dis. 76, 1-14 (1945).

20. Manwell, R.D. u. H.P. Drobeck: Mammalian toxoplasmosis in birds.
Exper. Parasit. 1, 83-93 (1951).

21. Mc Entegart, M.G. The maintance of stock strains of trich monads by freezing.
J. Hyg. 52, 545-550 (1954).

22. Mesnil, F. u. A. Sarrailhé: Toxoplasmose expérimentale de la souris: passage par les muqueuses; conservation du virus dans le cadavre.
C. R. Soc. Biol. 74, 1325-1327 (1913).

23. Möller, A. Ergebnisse tierexperimenteller und diagnostischer Toxoplasmoseuntersuchungen.
Deutsches Gesundheitswesen 10, 1163-1174 (1955).

24. Mraz, J. Přežívání Toxoplasma gondii in vitro.
Čsl. Parasit. 6, 165-172 (1959).

25. Mühlpfordt, H. Der Einfluß tiefer Temperaturen auf Protozoen.
Z. Tropenmed. Parasit. 11, 481-507 (1960

26. Orlandella, V. Ricerche sulla resistenza del Toxoplasma sottoposto a temperature varie. Acta Med. Vet. (Neapel) 3, 79 (1957). Ref.: Die Veterinärmedizin 13, 574 (1960).

27. Neumann, K.H. Grundriß der Gefriertrocknung. Musterschmidt, Göttingen (1955).

28. Pinkerton, H. u. R.G. Henderson: Adult toxoplasmosis. J. Amer. Med. Ass. 116, 807-814 (1941).

29. Polge, D., A.U. Smith u. A. Parkes: Revival of speratozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164, 666 (1949).

30. Polge, C. u. M.A. Soltys: Preservation of trypanosomas in the frozen state. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 51, 519-526 (1957).

31. Reuße, U. Konservierung einiger tierpathogener Protozoen durch Aufbewahrung bei tiefen Temperaturen. Z. Tropenmed. Parasit. 7, 99-109 (1956).

32. Rifaat, M.A. u. T. A. Morsy: Resistance of Toxoplasma gondii to external environmental factors. J. Trop. Med. Hyg. 66, 178-180 (1963).

33. Roever-Bonnet, H. De,: Influence of a few fluid media on Toxoplasma parasites. Trop. Geogr. Med. 12, 71-81 (1960).

34. Roger, F. u. A. Roger: Premiers résultats concernant la congélation de Toxoplasma gondii. Bull. Soc. Path. exot. 50, 208-211 (1957).

35. Rommel, M. u. I. Müller: Serologische Studien an Mäusen nach experimenteller Infektion mit einem Toxoplasmastamm vom Hund. Z. Parasitenk. 23, 360-366 (1963).

36. Sabin, A.B. u. P.K. Olitsky: Toxoplasma and obligate intracellular parasitism. Science 85, 336-338 (1937).

37. Weinman, D. u. A. H. Chandler: Toxoplasmosis in man and swine - an investigation of the possible relationship. J. Amer. Med. Ass. 161, 229-232 (1956).

38. Wildführ, G. Experimentelle Versuche zur Resistenz der Toxoplasmen. Z. Hyg. 143, 134-139 (1956).

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. J. Boch, möchte ich für die Überlassung des Themas, die jederzeit uneigennützigen Ratschläge und die mir bereitwilligst gewährte Unterstützung meinen tief empfundenen Dank aussprechen.

Herrn Dr. M. Rommel, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, mir mit seinem Wissen half, ebenso Frau Ilse Müller für die freundliche Hilfsbereitschaft bei allen meinen Wünschen meinen herzlichen Dank.

Lebenslauf

Ich, Volker Robl, wurde am 30. November 1938 als Sohn des Betriebs-Ing. Anton-Johann Robl und seiner Ehefrau Klara, geb. Schwedt in Berlin geboren.

1944-1945 besuchte ich die Grundschule in Zachin (Oderbruch), anschließend in Berlin die 11. Volksschule und Carl-Friedrich-von-Siemens-Schule in Siemensstadt und bestand 1959 an der Freiherr-vom-Stein-Schule zu Berlin-Spandau die Reifeprüfung.

Im April des gleichen Jahres wurde ich als Student der Veterinär-Medizin an der Freien Universität Berlin immatrikuliert. Die tierärztliche Vorprüfung bestand ich im Herbst 1961, das Staatsexamen im Herbst 1964. An der Tierklinik für Geburtshilfe der Freien Universität Berlin leistete ich meine Praktikantenzeit ab.